

基于网络药理学和分子对接预测何首乌改善脂质代谢紊乱作用机制及调脂作用研究

杨柯,段云天,池鑫宇,曹子茵,曾春晖
(广西中医药大学药学院,南宁 530200)

[摘要] **目的:**应用网络药理学和分子对接方法预测何首乌改善脂质代谢紊乱的作用机制。**方法:**借助软件 ChemDraw 绘制何首乌化学成分,基于 Swiss ADME, Swiss Target Prediction 平台与 Genecards, DisGeNET 数据库筛选出活性成分与改善脂质代谢紊乱的潜在靶点,通过软件 Cytoscape 和 STRING 数据库分别构建“药物-活性成分-潜在靶点”网络结构模型与蛋白质互作网络(PPI)网络,运用 DAVID 数据库对潜在靶点进行基因本体论(GO)与京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。借助软件 PyMOL, AutoDock 进行活性成分与核心靶点分子对接。长期灌胃给药 β -淀粉样前体蛋白/早老蛋白-1 双转基因小鼠(APP/PS1 小鼠)并统计其体质量和体脂率,检测血脂[三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)]水平。**结果:**筛选出 30 种何首乌活性成分以及 143 个治疗脂质代谢紊乱潜在靶点,富集分析显示何首乌与脂质代谢紊乱的共同生物学过程与蛋白磷酸化、蛋白结合、酶结合与蛋白激酶活性等相关,作用的主要通路为磷脂酰肌醇 3-激酶-蛋白激酶(PI3K-Akt)、缺氧诱导因子(HIF)-1、雌激素(estrogen)信号通路等。分子对接预测活性成分与核心靶点间稳定连接结构关系。动物实验结果显示,与模型组相比,各药物组体重无显著差异,但体脂率显著降低($P < 0.05$);蒸晒品对 TG, LDL-C 异常升高具有显著降低作用,但生品仅对 TG 有影响($P < 0.05$)。**结论:**何首乌有确切降脂作用,预测其机制为 ω -羟基大黄素-8-甲醚、苜蓿素、山奈酚等 3 种主要活性成分通过与表皮生长因子受体(EGFR)、雌激素受体 1(ESR1)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)等 3 个核心靶点结合,影响 PI3K-Akt, HIF-1, estrogen 信号通路来发挥。

[关键词] 何首乌;脂质代谢紊乱;网络药理学;分子对接;验证实验

[中图分类号] R965 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)11-1143-12

The mechanism of *Polygonum multiflorum* Thunb. to attenuate lipid metabolism disorder based on network pharmacology and molecular docking technology

YANG Ke, DUAN Yun-tian, CHI Xin-yu, CAO Zi-yin, ZENG Chun-hui

(College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

[Abstract] **Objective:** To predict the mechanism of *Polygonum multiflorum* Thunb. on attenuating lipid metabolism disorder by applying Network Pharmacology and Molecular Docking. **Methods:** Using software ChemDraw, the chemical constituents of *Polygonum multiflorum* Thunb. were drawn and documented. Main active ingredients and potential targets of attenuating lipid metabolism disorder were screened out based on the databases like Swiss ADME, Swiss Target Prediction platform and Genecards, and DisGeNET. The drug-active ingredients-potential targets network structure model and PPI network are constructed through the software Cytoscape and STRING database, respectively. Potential targets were analyzed by GO enrichment analysis, KEGG pathway enrichment analysis and visualized. Using software PyMOL and AutoDock, the active ingredients were docked with core target molecules. The body weight and body fat rate of APP/PS1 mice with long-term intragastric administration were measured and the content of serum lipid (TG, TC, HDL-C, LDL-C) were detected. **Results:** A total of 30 active ingredients of

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(82060718);国家中医药管理局“中药炮制传承技术传承基地”资助项目(桂中医药发[2022]9号)

[作者简介] 杨柯,男,硕士,教授,硕士生导师,主要从事中药药理研究。联系电话:(0771)2279423, E-mail:kyang_11@126.com。

[通讯作者] 曾春晖,女,博士,教授,博士生导师,主要从事中药炮制与药理研究。联系电话:(0771)2279423, E-mail:chzheng@163.com。

Polygonum multiflorum Thunb. and 143 potential targets for the treatment of lipid metabolism disorder were obtained. The enrichment analysis shows that the common biological process of *Polygonum multiflorum* Thunb. and metabolic disorders are related to protein phosphorylation, protein binding, enzyme binding, protein kinase activity biological processes, and the signalling pathways of PI3K-Akt, HIF-1, estrogen are mainly involved in the major therapeutic role. Molecular docking predicts the stable connection structure between the active component and the core targets. The results of animal experiments showed that compared with the model group, there was no significant difference in weight between drug administered groups and the body fat rate decreased significantly ($P < 0.05$). Steaming and sun-buring products had significant effect on the abnormal increase of TG and LDL-C, but crude *Polygonum multiflorum* Thunb. only had an impact on TG ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Polygonum multiflorum* Thunb. has a significant lipid-attenuating effect. The mechanism is predicted to be related with three main active ingredients, including omega-hydroxytroxanin-8-methyl ether, Tricin and Kaempferolare, and PI3K-Akt, HIF-1 and Estrogen signaling pathways are affected through three core targets of EGFR, ESR1 and MMP9.

[Key words] *Polygonum multiflorum* Thunb.; lipid metabolism disorder; network pharmacology technology; molecular docking technology; verification experiment

脂质代谢是人体主要代谢之一,包括脂肪代谢、胆固醇代谢和磷脂代谢。当物质摄入、代谢出现问题就可能导致脂质代谢紊乱。脂质代谢紊乱是临床上常见的代谢性生理病理过程,影响脂质在生物体内的合成、分解、消化、吸收或转运^[1]。如现代医学中的高脂血症、冠状动脉粥样硬化、脂肪肝、肥胖等,主要表现为三酰甘油(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)升高以及高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)降低。临床上常用他汀类、贝特类及盐酸类等药物进行治疗,以他汀类为主^[2],但长期服用会面临药物不良反应,包括他汀相关的肌肉症状(SAMS)及肝肾功能损害等。中药及中药成分在调控体内脂质代谢有较高安全性和明显的疗效。何首乌始载于《开宝本草》,为蓼科植物何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb., PM)的干燥块根。其作为一种常用补益良药,在医疗、保健中使用频率高、范围广。何首乌已被现代实验研究证明有良好的调脂功能^[3-5],对调控脂质代谢有其独特优势。系统地梳理和研究何首乌改善脂质代谢紊乱的活性成分和作用机制,将为何首乌的实验研究提供新的方向。

网络药理学是一种药物研究的新模式,通过多学科交叉应用与整体生物网络的分析、重新整合,应用作用通路关系模型,多角度建立药物相关靶点,进而揭示药物在各个网络模块中与特定节点之间相互作用的关系,有助于缩减药物开发的时间与成本^[6]。分子对接技术为计算机辅助药物设计的一种方法,其将药物的药理作用提升到分子水平,从分子水平阐明中药效应成分与靶标的作用机制^[7]。网络药理学结合分子对接方法可更加全面、系统地进行药物治疗疾病机制研究。

本研究拟借助网络药理学与分子对接方法构建何首乌改善脂质代谢紊乱的“药物-活性成分-潜在靶点”的网络关系模型并预测其通路机制,旨在为阐明何首乌对改善脂质代谢紊乱的药效物质及作用机制提供理论参考,并为后续深入开展实验研究和应用开发提供指导。

材料与方法

1 实验动物

80只2月龄雄性APP/PS1小鼠及8只2月龄雄性野生型C57BL/6J小鼠均购自常州卡文斯实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(苏)2016-0010。实验小鼠于广西中医药大学SPF级动物实验室饲养,12h明暗交替,饲养环境温度(22 ± 2)℃,相对湿度(50 ± 10)%,常规小鼠饲料喂养。

2 药材

何首乌购于广东省肇庆市德庆县,经广西中医药大学药用植物学教研室郭敏副教授鉴定为蓼科植物何首乌。

3 试剂

TG(批号:20210703),TC(批号:20210702),HDL-C(批号:20210702),LDL-C(批号:20210702)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

4 仪器

ME204E分析电子天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];ST16R冷冻低速离心机(美国赛默飞公司);Multiskan SkyHigh全波长酶标仪(美国赛默飞公司)。

5 何首乌活性成分筛选及对应靶点预测

通过文献^[8-9]整合何首乌的主要化学成分,借

助软件 ChemDraw 16.0 绘制化合物结构保存为 sdf 格式文件并通过 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 与化源网 (<https://www.chemsrc.com/>) 数据库进行核对,得到何首乌化学成分结构图。基于 Swiss ADME 平台^[10] (<http://www.swissadme.ch/>) 预测何首乌的活性成分,将化合物(sdf 格式文件)上传至平台分析,通过设定化合物胃肠道吸收(gastrointestinal absorption; GI absorption)为“high”与类药性分析(Lipinski, Ghose, Veber, Egan, Muegge)中有 ≥ 2 个为“Yes”的条件,可筛选出具有较好口服生物利用度、与已知药物的相似性较高的化合物作为活性成分。将活性成分(sdf 格式文件)导入 Swiss Target Prediction 平台^[11] (<http://www.swisstargetprediction.ch/>),物种限定“Homo sapiens”,收集“Probability” > 0.1 的靶点为药物活性成分靶点。

6 脂质代谢紊乱疾病靶点收集

以“Lipid metabolism disorder”为关键词,基于 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库进行疾病靶点检索与收集, GeneCards 数据库筛选出“Relevance score” ≥ 20 的疾病靶点,合并去除重复靶点获得脂质代谢紊乱疾病相关靶点。

7 潜在靶点与网络结构模型构建

药物活性成分靶点与疾病相关靶点进行比对并展开维恩图(Venn)分析,取交集靶点为潜在靶点,借助软件 Cytoscape 3.6.1 建立“药物-活性成分-潜在靶点”网络模型,将潜在靶点导入 STRING 在线工具 (<https://www.string-db.org/>) “Multiple proteins”一栏中,物种限定“Homo sapiens”,最低相互作用阈值选项“medium confidence”,其余选择默认参数完成蛋白质互作网络(protein-protein interaction networks, PPI)网络构建。

8 基因本体论(gene ontology, GO)富集分析及京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析

应用 DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>) 数据库^[12-14],将潜在靶点导入“Gene List”,物种限定“Homo sapiens”,对潜在靶点进行 GO 富集分析及 KEGG 通路富集分析,结果经筛选后作可视化图分析。

9 分子对接

选取何首乌活性成分中对应较多靶点的 ω -羟基大黄素-8-甲醚、苜蓿素、山奈酚与核心靶点蛋白做初步分子对接验证。PubChem 数据库中查找并下

载分子结构,借助软件 Chem3D 16.0 转化成小分子 3D 格式文件,通过 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获得核心靶点表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR) (2ITX)、雌激素受体 1 (estrogen receptor 1, ESR1) (6VJ1)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP9) (6ESM) 的蛋白结构,利用软件 AutoDock 4.2.6 对蛋白进行预处理(除去水、氢、小分子配体等)后,将化合物小分子与蛋白进行分子对接,统计结合稳定性参数,通过软件 PyMOL 制图实现结果可视化。

10 何首乌对 APP/PS1 小鼠脂质代谢的影响

10.1 药物制备及给药方法 取黑豆 10 kg,加水适量,约煮 4 h 后,熬汁可得约 15 kg 黑豆汁,滤出豆渣后再加水适量约煮 3 h,熬汁可得约 10 kg,合并收集 2 次煮制黑豆汁约 25 kg。100 kg 何首乌生品饮片在黑豆汁中浸润 1 h 后用常压蒸箱制 4 h,曝晒 6 h,重复 9 次,每个程度的炮制品均按比例留样备用。水煎液制备:取何首乌生品(R0)至九蒸晒品(P9)10 种炮制程度的药材各 10 kg,加 8 倍量水,浸润 1 h,煮制 1.5 h 过滤药液,再加入 8 倍量水煮制 1.5 h,合并 2 次药液,水浴浓缩至大约 1.5 g(生药)·mL⁻¹ 的流浸膏状态,于 -20 °C 保存待用。

80 只 APP/PS1 小鼠随机分为模型组(model, M)、阳性组(positive, P)、何首乌生品低剂量组(R0-L)、何首乌生品高剂量组(R0-H)、何首乌三蒸晒品低剂量组(P3-L)、何首乌三蒸晒品高剂量组(P3-H)、P6-L、P6-H、P9-L、P9-H 共 10 个动物分组,8 只 2 月龄雄性野生型 C57BL/6J 小鼠设为正常对照组(wild type, WT)。以灌胃(ig)给予动物药物干预,给药容积 20 mL·kg⁻¹,持续给药 6 个月,1 次·d⁻¹,WT 和 M 组 ig 生理盐水,P 组 ig 0.02 mg·kg⁻¹ 石杉碱甲,何首乌药物组给予相应蒸晒程度水煎液,高剂量 10 g(生药)·kg⁻¹,低剂量 5 g(生药)·kg⁻¹。

10.2 检测方法 收集取材前 1 周每只小鼠体质量数据,取每只小鼠 7 d 体质量均值进行统计。末次给药 2 h,麻醉小鼠后腹主动脉取血,4 000 r·min⁻¹,4 °C 离心 10 min,留取血清根据试剂盒说明书检测血脂(TG, TC, HDL-C, LDL-C)水平。取血后 4 °C 的生理盐水心脏灌注,留取附睾脂肪和皮下脂肪称质量,计算小鼠体脂率(脂肪质量与体质量之比)。

10.3 统计学方法 采用 GraphPad prism 6.0 软件对数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数值比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 视为差异

具有统计学意义。

结 果

1 何首乌活性成分

根据文献记载并借助软件 ChemDraw 绘制何首

乌化学成分,在 PubChem 与化源网数据库中核对化合物结构,经 Swiss ADME 与 Swiss Target Prediction 平台筛选后去除不符合设定条件且无靶点的活性成分,最终得到 30 个满足条件的化合物,见表 1。

表 1 何首乌活性成分

编号	化合物	分子式	编号	化合物	分子式
PM1	2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-木糖苷	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	PM16	大黄素-1,6-二甲醚	C ₁₇ H ₁₄ O ₅
PM2	白藜芦醇	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	PM17	洋地黄萜醌	C ₁₆ H ₁₂ O ₄
PM3	白藜芦醇-4'-O-β-D-葡萄糖苷	C ₂₇ H ₂₆ O ₁₂	PM18	2-甲氧基-6-乙酰基-7-甲基胡桃酮	C ₁₄ H ₁₂ O ₅
PM4	二氢白藜芦醇-3-O-葡萄糖苷	C ₂₀ H ₂₄ O ₈	PM19	苜蓿素	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
PM5	虎杖甙	C ₂₀ H ₂₂ O ₈	PM20	芹菜素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
PM6	大黄酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	PM21	山奈酚	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
PM7	大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	PM22	槲皮素	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
PM8	大黄素甲醚	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	PM23	对苯二酚	C ₆ H ₆ O ₂
PM9	大黄素-3-乙醚	C ₁₇ H ₁₅ O ₅	PM24	2,6-二羟基苯甲酸	C ₇ H ₆ O ₄
PM10	大黄酸	C ₁₅ H ₈ O ₆	PM25	没食子酸	C ₇ H ₆ O ₅
PM11	ω-羟基大黄素	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	PM26	4-甲基-3-苯甲醚-1-O-葡萄糖苷	C ₁₃ H ₁₈ O ₈
PM12	ω-羟基大黄素-8-甲醚	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	PM27	反式-N-咖啡酰酪胺	C ₁₇ H ₁₇ NO ₃
PM13	大黄素-8-甲醚	C ₁₆ H ₁₁ O ₅	PM28	没食子酸甲酯	C ₈ H ₈ O ₅
PM14	大黄素-6,8-二甲醚	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	PM29	N-反式-阿魏酰-3-甲氧基酪胺	C ₁₉ H ₂₁ NO ₅
PM15	2-乙酰基大黄素	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	PM30	五味子素	C ₂₄ H ₃₂ O ₇

2 潜在靶点

基于 Swiss Target Prediction 平台所得活性成分靶点,筛选出“Probability” > 0.1 的靶点,合并去除重复项后得到 338 个作为药物活性成分的靶点。通过 GeneCards 与 DisGeNET 数据库设置筛选条件后获得与脂质代谢紊乱疾病相关靶点 1 375 个。进行比对并开展维恩图分析,取交集靶点为潜在靶点,得到 143 个潜在靶点,见图 1 和表 2。

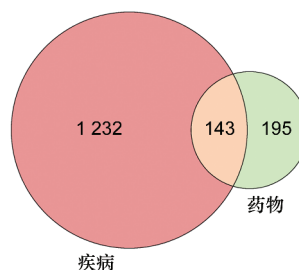


图 1 何首乌改善脂质代谢紊乱潜在靶点的维恩图

表 2 何首乌改善脂质代谢紊乱潜在靶点

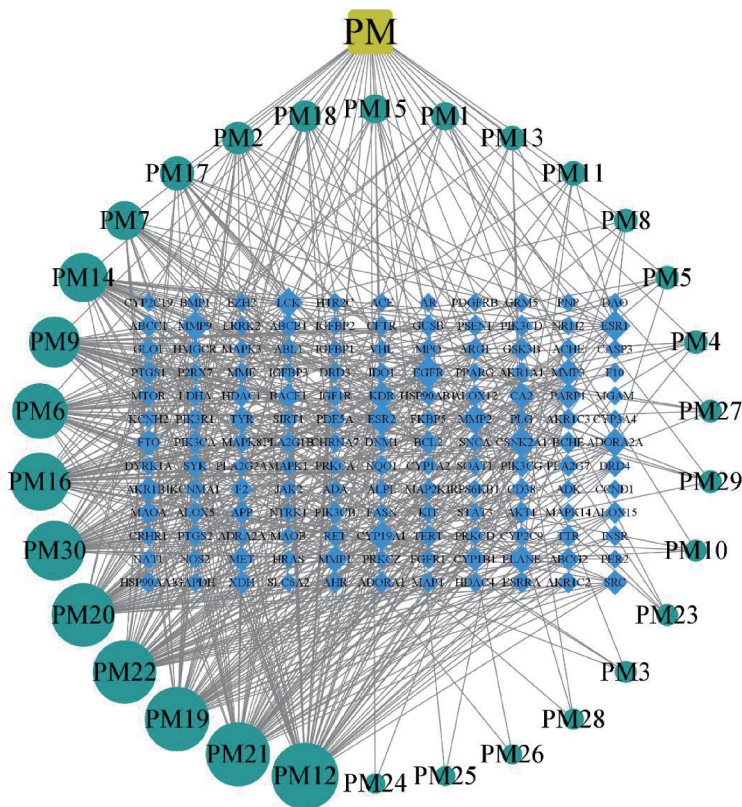
编号	潜在靶点	编号	潜在靶点	编号	潜在靶点	编号	潜在靶点	编号	潜在靶点
1	ABCB1	30	CASP3	59	FTO	88	MAP2K1	117	PIK3R1
2	ABCC1	31	CCND1	60	GAPDH	89	MAPK1	118	PLA2G1B
3	ABCG2	32	CD38	61	GLO1	90	MAPK14	119	PLA2G2A
4	ABL1	33	CFTR	62	GRM5	91	MAPK3	120	PLA2G7
5	ACE	34	CHRNA7	63	GSK3B	92	MAPK8	121	PLG
6	ACHE	35	CRHR1	64	GUSB	93	MAPT	122	PNP
7	ADA	36	CSNK2A1	65	HDAC1	94	MET	123	PPARG
8	ADK	37	CYP19A1	66	HDAC4	95	MGAM	124	PRKCA
9	ADORA1	38	CYP1A2	67	HMGCR	96	MME	125	PRKCD
10	ADORA2A	39	CYP1B1	68	HRAS	97	MMP1	126	PRKCZ
11	ADRA2A	40	CYP2C19	69	HSP90AA1	98	MMP2	127	PSEN1
12	AHR	41	CYP2C9	70	HSP90AB1	99	MMP3	128	PTGS1
13	AKR1A1	42	CYP3A4	71	HTR2C	100	MMP9	129	PTGS2

编号	潜在靶点	编号	潜在靶点	编号	潜在靶点	编号	潜在靶点	编号	潜在靶点
14	AKR1B1	43	DAO	72	IDO1	101	MPO	130	RET
15	AKR1C2	44	DNM1	73	IGF1R	102	MTOR	131	RPS6KB1
16	AKR1C3	45	DRD3	74	IGFBP1	103	NAT1	132	SIRT1
17	AKT1	46	DRD4	75	IGFBP2	104	NOS2	133	SLC6A2
18	ALOX12	47	DYRK1A	76	IGFBP3	105	NQO1	134	SNCA
19	ALOX15	48	EGFR	77	INSR	106	NR1H2	135	SOAT1
20	ALOX5	49	ELANE	78	JAK2	107	NTRK1	136	SRC
21	ALPL	50	ESR1	79	KCNH2	108	P2RX7	137	STAT3
22	APP	51	ESR2	80	KCNMA1	109	PARP1	138	SYK
23	AR	52	ESRRA	81	KDR	110	PDE5A	139	TERT
24	ARG1	53	EZH2	82	KIT	111	PDGFRB	140	TTR
25	BACE1	54	F10	83	LCK	112	PER2	141	TYR
26	BCHE	55	F2	84	LDHA	113	PIK3CA	142	VHL
27	BCL2	56	FASN	85	LRRK2	114	PIK3CB	143	XDH
28	BMP1	57	FGFR1	86	MAOA	115	PIK3CD		
29	CA2	58	FKBP5	87	MAOB	116	PIK3CG		

3 “药物-活性成分-潜在靶点”网络

应用软件 Cytoscape 绘制“药物-活性成分-潜在靶点”网络,见图 2。图中共包括 174 个节点(药物 1 个,活性成分 30 个,靶点 143 个)和 625 条边,其中 Degree 值表示某活性成分与靶点之间相互作用数

目,值越大则表示生物功能越多,作用越强。结果显示活性成分中 ω-羟基大黄素-8-甲醚(55)、苜蓿素(52)、山奈酚(52),潜在靶点 EGFR(17), ESR1(15), CSNK2A1(15), ESR2(15), MMP9(14)具有较高的 Degree 值,表明其具有较高的生物学意义。



黄色矩形:药物名称;绿色圆形:活性成分;蓝色菱形:潜在靶点;连线:节点之间相互关系;圆形大小:Degree 值的大小

图 2 药物-活性成分-潜在靶点网络图



4 PPI 网络构建

对潜在靶点进行蛋白互作分析,应用 STRING 数据库得到 PPI 网络关系数据,使用软件 Cytoscape 对数据进行可视化分析,构建 PPI 网络,见图 3,其中网络节点 143 个,边数 1 792 条,各节点代表潜在靶点,边则表示各靶点之间相互作用关系,边数越多则关联度 (Degree 值) 越大。将图中各节点 Degree

值从大到小排序,靶点 AKT1, MAPK3, CASP3, EGFR, SRC, MAPK1, ESR1, MAPK8, STAT3, MMP9 的位次靠前,且在“药物-活性成分-潜在靶点”网络图中显示, EGFR, ESR1, MMP9 均可作用于 14 个以上活性成分,表明何首乌的活性成分可能通过 EGFR, ESR1, MMP9 等核心靶点发挥改善脂质代谢紊乱的作用。

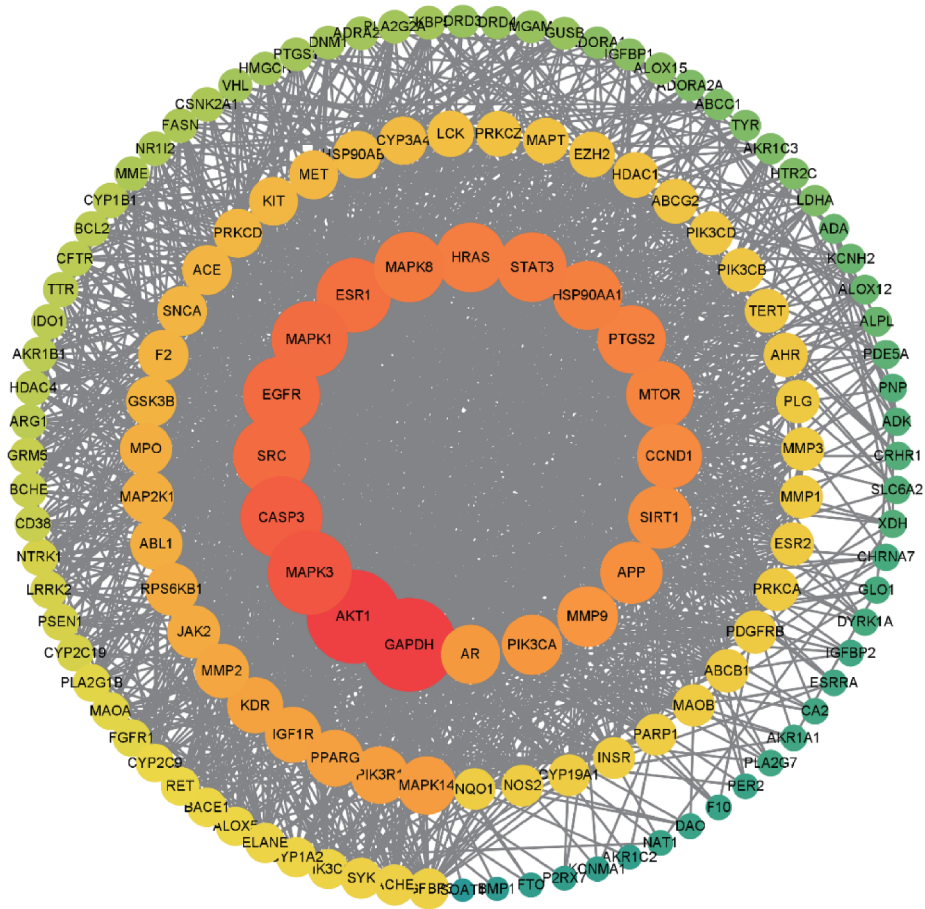
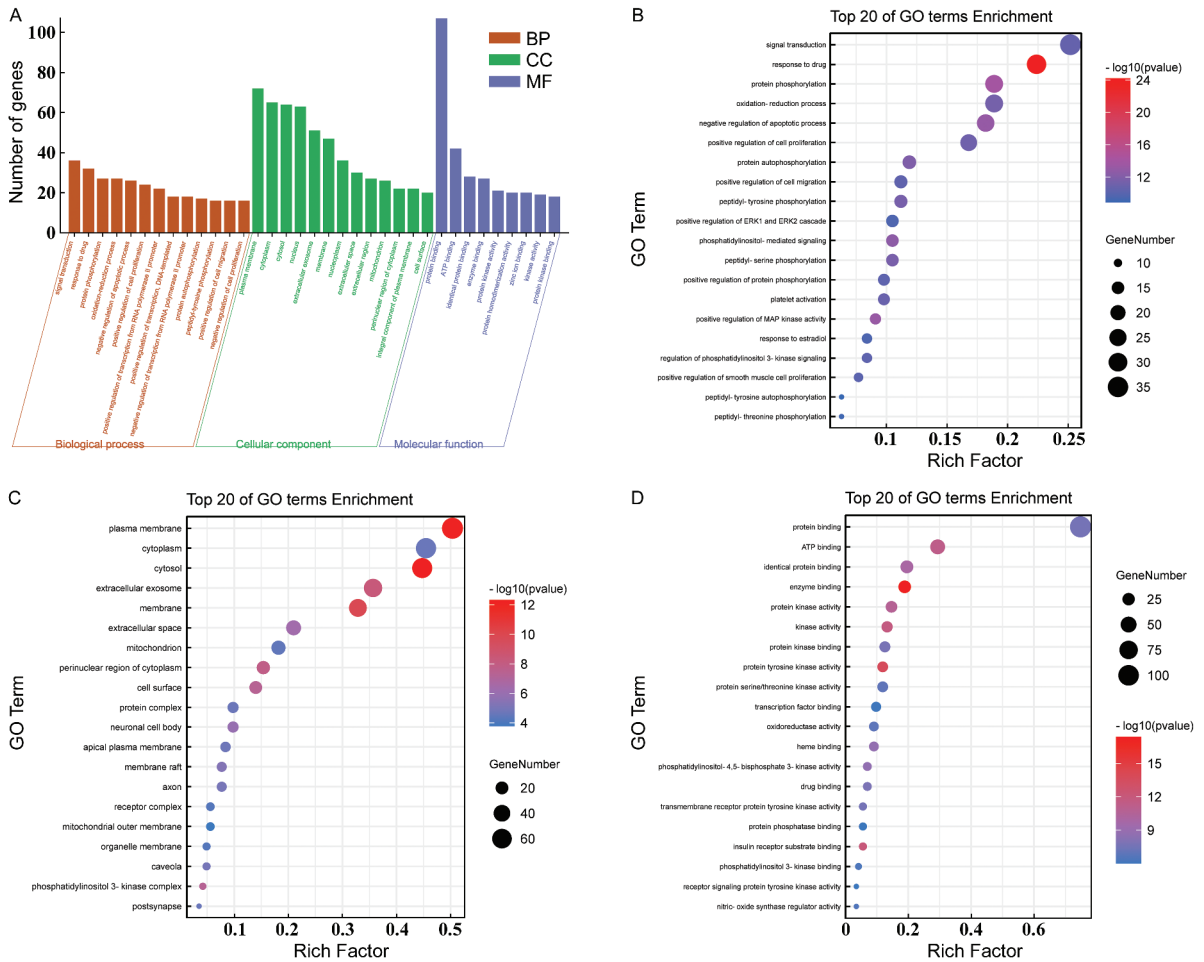


图 3 PPI 蛋白互作网络图

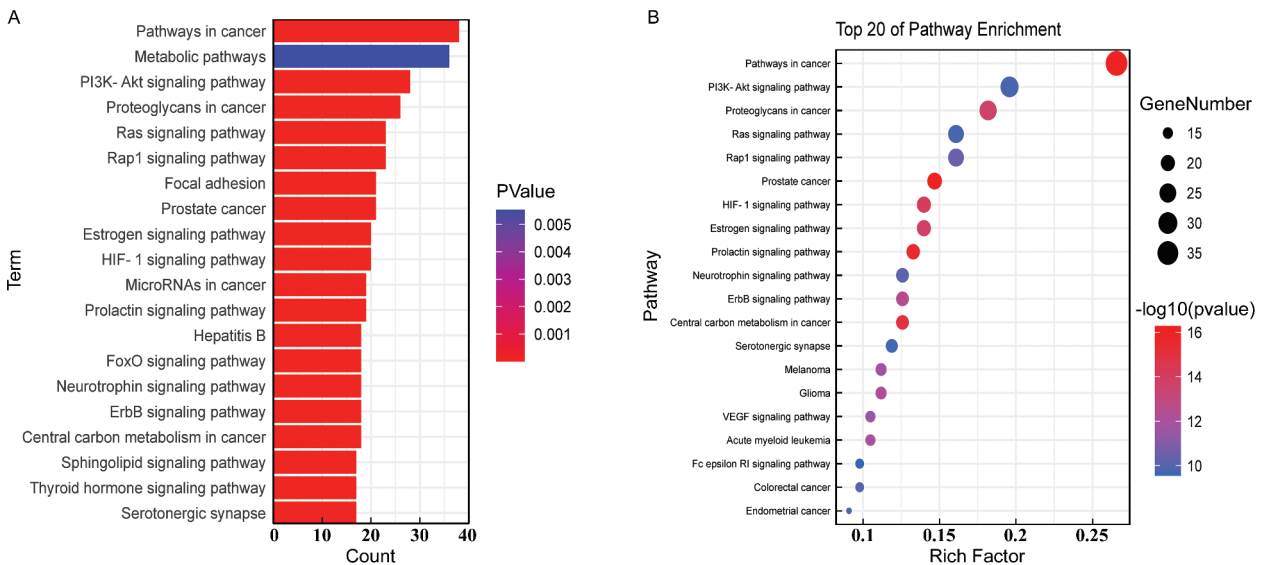
5 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析

借助 DAVID 数据库对潜在靶点进行 GO 富集分析与 KEGG 通路富集分析,进一步阐明潜在靶点发挥的作用。GO 富集分析主要分为 3 类分析条目:生物进程 (biological process)、细胞成分 (cellular component) 和分子功能 (molecular function)。以各分析条目做横坐标、基因数目做纵坐标,对 3 类分析条目中基因数目较高的相关条目进行汇总制图。富集显著性以气泡图体现,GO 富集分析各类分析条目以 P 值 < 0.01 为界限,从小到大取排序靠前 20

位分析条目进行作图,见图 4。KEGG 通路富集分析选取基因数目最多的 20 位绘制富集条形图,同时选取 P 值从小到大排序前 20 位进行可视化作图,见图 5,图中富集因子 (rich factor) 表示位于该条目中基因数目与该条目基因总数的比值,该值越大则表明富集的程度越高;图中原点的颜色表示 P 值富集的显著性,由蓝色至红色变化,颜色越偏向红色则表示 P 值越小,显著性越强;圆点大小表示该类条目中参与的靶点数目。



A:GO 富集分析 3 类分析条目汇总表;B:生物过程富集气泡图;C:细胞成分富集气泡图;D:分子功能富集气泡图
图 4 GO 富集分析结果



A: KEGG 富集条形图;B:KEGG 通路富集气泡图
图 5 KEGG 富集分析结果

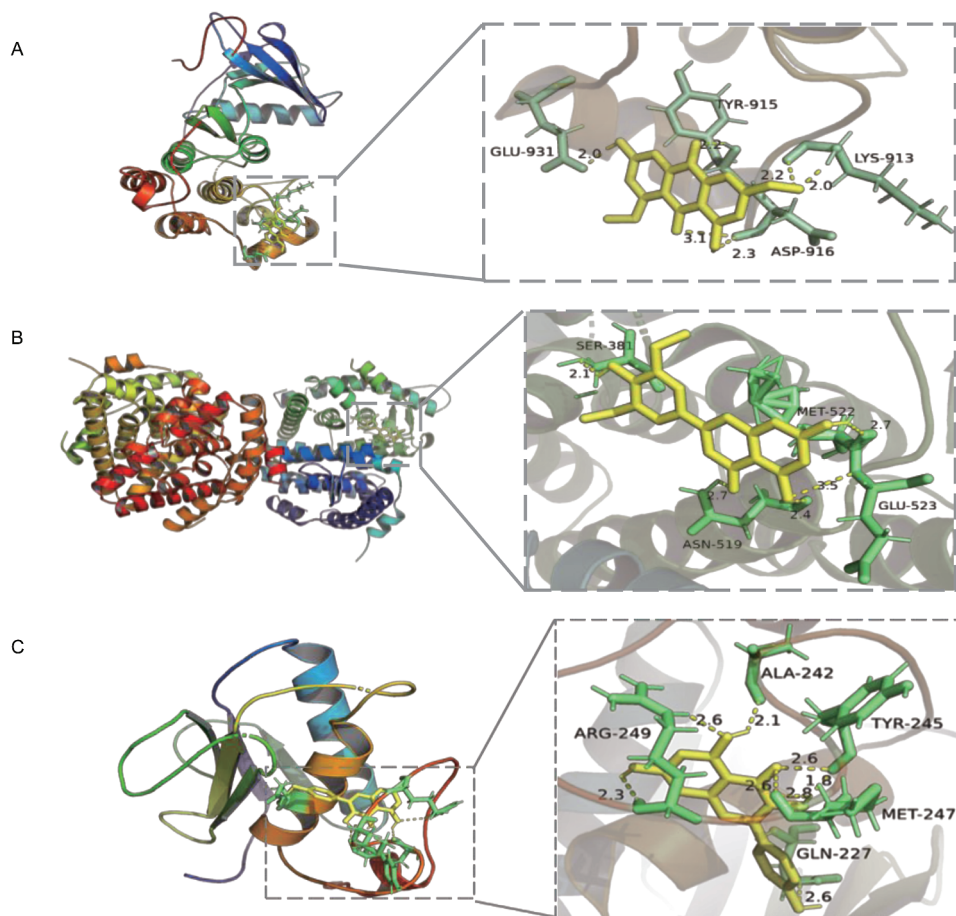
GO 富集分析结果图中显示,潜在靶点主要用于质膜(plasma membrane)、细胞质(cytoplasm)、胞液(cytosol)、细胞核(nucleus)等细胞成分,在分子功能中则发挥蛋白结合(protein binding)、ATP结合(ATP binding)、酶结合(enzyme binding)、蛋白激酶活性(protein kinase activity)等作用,从而参与信号转导(signal transduction)、药物响应(response to drug)、蛋白磷酸化(protein phosphorylation)、氧化还原过程(oxidation-reduction process)等相关生物进程。富集气泡图则表明3类条目中蛋白磷酸化、蛋白结合、酶结合与蛋白激酶活性等富集限度较高。KEGG 通路富集分析显示参与代谢通路(metabolic pathways)靶点数目较高且位次靠前,且通过对比图4和图5推测何首乌改善脂质代谢紊乱的途径可能与磷脂酰肌醇3-激酶-蛋白激酶(PI3K-Akt)、缺氧诱导因子(HIF-1)、雌激素(estrogen)信号通路相关。

6 分子对接

将何首乌活性成分 ω -羟基大黄素-8-甲醚、苜蓿素、山奈酚与核心靶点 EGFR, ESR1, MMP9 分别进行分子对接,结果见表3。结合能 $< -5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 表明受体与配体分子之间能形成稳定的结合,结合能越低则表明二者结合效果越好。其中结合能较低分子结合模式示意图见图6。结果显示,活性成分与核心靶点都具有稳定的结合,可形成稳定的对接结构。

表3 何首乌活性成分与核心靶点对接结合能
 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$

活性成分	核心靶点		
	EGFR	ESR1	MMP9
ω -羟基大黄素-8-甲醚	-7.31	-5.75	-7.08
苜蓿素	-5.5	-6.4	-5.87
山奈酚	-9.76	-9.73	-9.72



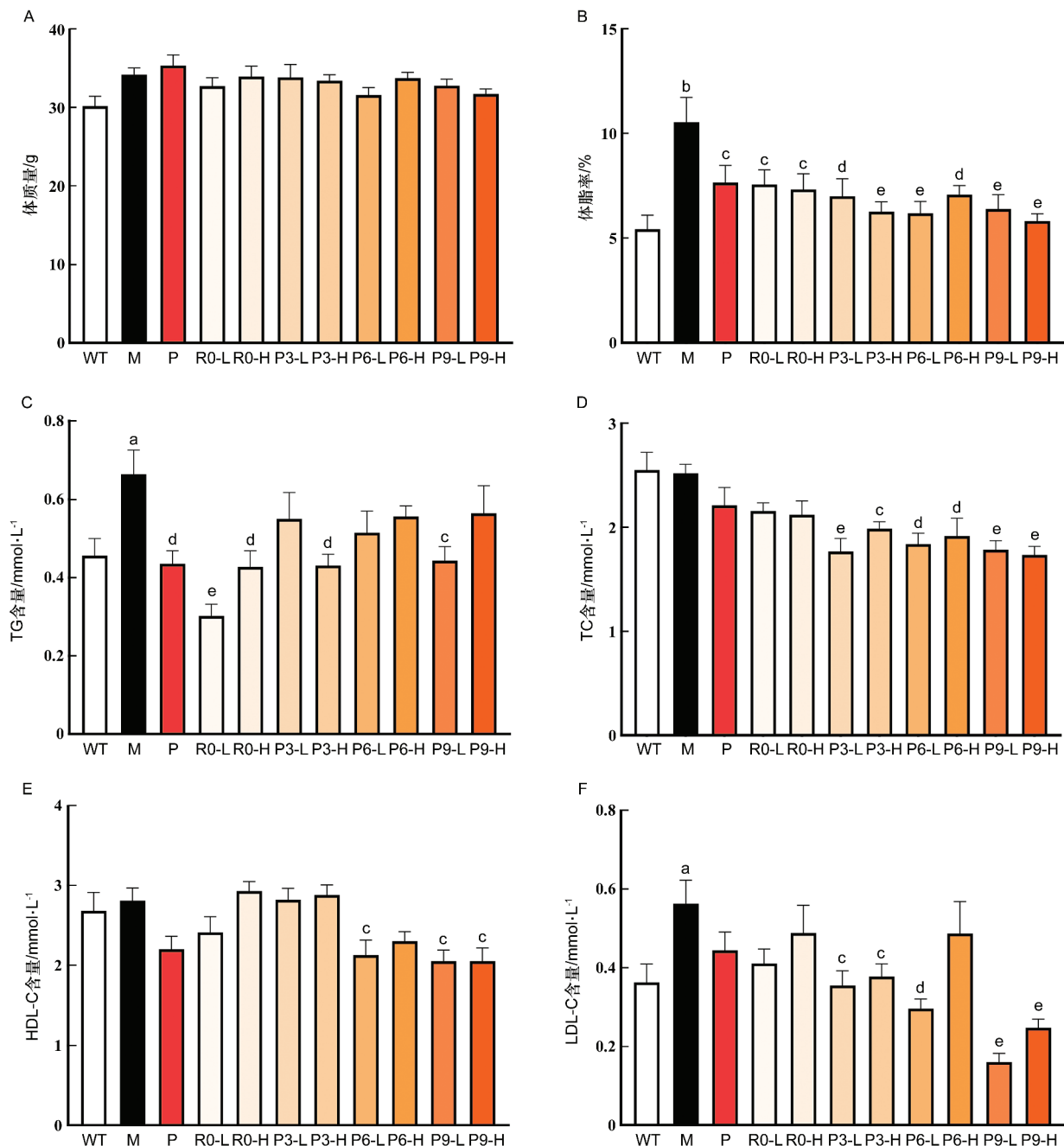
A: ω -羟基大黄素-8-甲醚与 EGFR 分子对接;B:苜蓿素与 ESR1 分子对接;C:山奈酚与 MMP9 分子对接

图6 部分分子对接示意图

7 何首乌对 APP/PS1 小鼠脂质代谢的影响

7.1 对 APP/PS1 小鼠体质量及体脂率的影响 经 6 个月长期 *ig* 后, 各组体质量无明显差异, 体脂率结果显示, M 组体脂率显著高于 WT 组 ($P < 0.01$), 与

M 组相比, 何首乌给药组小鼠体脂率均有显著性下降 ($P < 0.05$), 且与蒸晒程度相关, 见图 7。观察小鼠脂肪组织, M 组脂肪量明显高于 WT 组, 何首乌给药组脂肪量明显低于 M 组, 见图 8。



A: 各组小鼠体质量; B: 各组小鼠体脂率; C: 各组小鼠血清 TG 含量; D: 各组小鼠血清 TC 含量; E: 各组小鼠血清 HDL-C 含量; F: 各组小鼠血清 LDL-C 含量; 与 WT 组比较, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与 M 组比较, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, e: $P < 0.001$

图 7 不同蒸晒程度何首乌对 APP/PS1 小鼠脂质代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

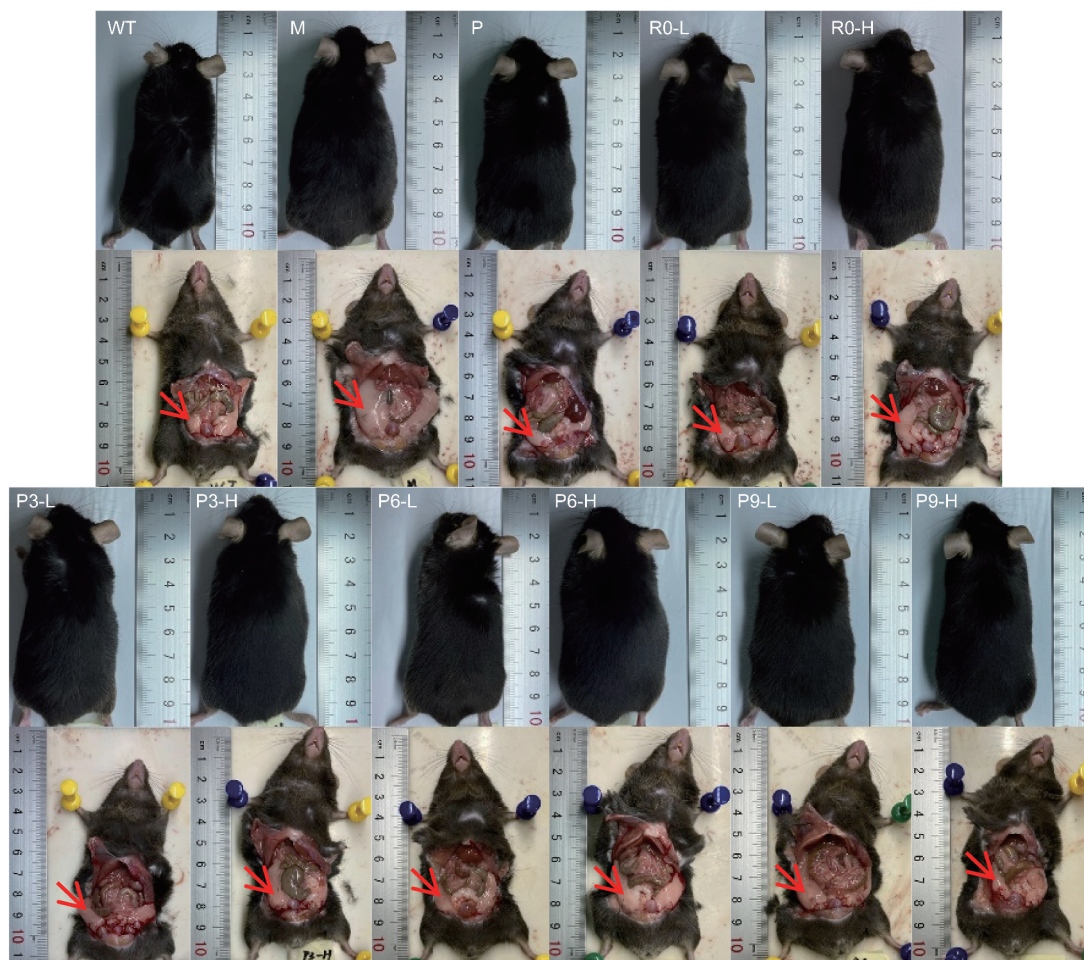


图8 小鼠背部与脂肪组织展示图

7.2 对 APP/PS1 小鼠血脂水平的影响 与 WT 组相比, M 组血清 TG 与 LDL-C 含量显著升高 ($P < 0.05$); 与 M 组相比, P, R0, P3-H, P9-L 组血清 TG 含量显著降低 ($P < 0.05$), P3, P6-L, P9 组血清 LDL-C 含量显著降低 ($P < 0.05$), 见图 7。

讨 论

“脂质代谢紊乱”、“高脂血症”等为现代病名, 我国古代医学中并无此名, 但对其实质的认识却有章可循。《黄帝内经》中的“膏脂学说”是中医学对其最早的认识, 是中医认识脂质代谢紊乱的重要理论依据。《灵枢·卫气失常论》有“人有脂, 有膏, 有肉”之论, 当膏脂异常时便会产生形体变化。《辞源》写到“脂也, 凝者曰脂, 释者为膏”, 两者常统称为膏脂。《灵枢·五癩津液别》曰: “五合之津液和含而为膏者, 内渗于骨空, 补益脑髓, 而下流阴谷。”而《医学正传》也言: “津液黏稠, 为痰为饮, 积久渗入

脉中, 血为之浊。”所以生理性的膏脂同源与机体中的血液、精髓等水谷精微, 病理性的膏脂属中医学中“浊物”范畴^[15-17], 可见, 脂质代谢紊乱由膏脂的病理状态引起, 与现代医学的脂质代谢紊乱致病高度吻合。

目前何首乌对脂质代谢紊乱具有一定的改善作用且在临床上有一定的推广价值^[18], 且制首乌对患者疗效更佳, 可降低不良反应的产生。蒽醌类化合物包含大黄素、大黄酸等成分, 可能通过蛋白酪氨酸激酶 2 (JAK2)/信号转导子与激活子 3 (STAT3) 通路延缓 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化斑块的形成^[5]。其提取物则可通过调节肝脏脂质代谢和葡萄糖转运蛋白的表达来减轻非酒精性脂肪变性和胰岛素抵抗, 并可通过抑制脂肪生成以及通过脂类分解和脂肪酸氧化作用来减轻 3T3-L1 细胞和高脂饮食诱导的肥胖小鼠发生的肥胖^[3-4]。APP/PS1 小鼠为经典阿尔茨海默病 (AD) 动物模型, 高脂饮食饲养

APP/PS1 小鼠会导致血糖失调且加剧肥胖^[19], 本实验结果也显示 APP/PS1 小鼠长期饲养后体重无明显变化而体脂率显著升高, 表明该模型可引发小鼠脂质代谢紊乱。何首乌不同蒸晒品长期给药, 随着蒸晒程度增加, 小鼠体重无明显变化且体脂率呈下降趋势, 同时各药物组可通过影响不同血脂成分调节小鼠脂质代谢, 生品与阳性药主要影响 TG 水平, 蒸晒品主要影响 TC, HDL-C, LDL-C 的水平, 从而发挥对 APP/PS1 小鼠脂质代谢紊乱的改善作用。因此, 对何首乌改善脂质代谢紊乱与基于“脂代谢”途径改善 AD 相关的机制研究具有重要意义。

通过网络药理学方法获得“药物-活性成分-潜在靶点”及 PPI 网络, 按关联度排序, 可推测 ω -羟基大黄素-8-甲醚、苜蓿素、山奈酚等为主要活性成分, 可通过 EGFR, ESR1, MMP9 等核心靶点发挥改善脂质代谢紊乱的作用。分子对接结果也预测活性成分 ω -羟基大黄素-8-甲醚、苜蓿素、山奈酚与核心靶点 EGFR, ESR1, MMP9 的结合均具有较好的亲和力。EGFR 是表皮生长因子受体家族成员之一, 作为重要信号转导的参与者分布于细胞膜上, EGFR 可通过调节转录因子来控制脂肪酸的合成和脂解作用, 在脂肪变性中起着重要的作用, 使用 EGFR 抑制剂治疗可消除肝脏再生过程中的脂肪堆积, 通过下调 EGFR 表达, 参与脂肪酸合成相关酶的基因表达有所降低, 且可上调脂解酶的表达^[20-21]。激活的 EGFR-PI3K-Akt 信号转导通过上调低密度脂蛋白受体 (LDLR) 来促进胆固醇摄取、葡萄糖代谢、脂肪生成^[22]。ESR1 也称为雌激素受体 α ($ER\alpha$), 性激素的靶器官是肝脏, 肝细胞中需存在 $ER\alpha$ 以维持脂质稳态。肝脏中通过 $ER\alpha$ 传递的雌激素信号有助于预防肝胰岛素抵抗和降低脂质代谢紊乱疾病的风险^[23-24]。研究表明 MMP9 的多态性使其有望成为动脉粥样硬化的生物标志物^[25-26]。

为进一步分析何首乌改善脂质代谢紊乱相关作用及通路, 对潜在靶点进行 GO 及 KEGG 通路富集分析。GO 富集分析结果显示潜在靶点可能主要涉及信号转导、蛋白磷酸化等相关生物进程, 通过蛋白结合、酶结合与蛋白激酶活性等分子功能进行参与。KEGG 通路富集分析结果可推测何首乌改善脂质代谢紊乱可能与 PI3K-Akt, HIF-1, estrogen 信号通路相关。通过激活 EGFR-PI3K-Akt 信号转导会导致胆固醇摄取增加和脂肪生成^[22], 通过抑制 PI3K-Akt 信号通路可在患有高脂血症的大鼠中检测到 TC,

TG 水平下降以及脂肪酸合酶和脂蛋白脂肪酶的上调, 从而调节脂质代谢进程^[27]。HIF-1 α 是一种转录因子, 在缺氧的适应性反应中可发挥调节肝脂质代谢作用。HIF-1 影响 lipin1 的表达可以防止在非酒精性脂肪肝疾病进程中肝脂质过多积聚^[28]。estrogen 通过 $ER\alpha$ 降低 TG 含量从而减少肝脂肪变性^[29]。脂质代谢紊乱在大脑中会加速 AD 的形成^[30-32], PI3K-Akt, HIF-1, estrogen 信号通路均对改善 AD 具有一定影响^[33-35], 可推测何首乌通过调节脑内脂质代谢途径从而达到改善 AD 的效果, 为后续脂质代谢紊乱与 AD 相关联实验研究提供新思路与方法。

综上所述, 本研究表明何首乌治疗脂质代谢紊乱主要活性成分可能为 ω -羟基大黄素-8-甲醚、苜蓿素、山奈酚等, 主要作用于 EGFR, ESR1, MMP9 等核心靶点且具有稳定连接结构关系, 并在蛋白磷酸化、蛋白结合、酶结合与蛋白激酶活性生物进程以及调节 PI3K-Akt, HIF-1, estrogen 信号通路中发挥主要治疗作用, 该研究结果为后续深入研究何首乌治疗脂质代谢紊乱奠定理论基础。

[参 考 文 献]

- [1] 窦智勇, 张威. 近十年针灸治疗高脂血症的临床现状[J]. 按摩与康复医学, 2021, 12(5): 46-49, 57.
- [2] 诸骏仁, 高润霖, 赵水平, 等. 中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(10): 937-953.
- [3] CHOI RY, LEE HI, HAM JR, et al. Heshouw (Polygonum multiflorum Thunb.) ethanol extract suppresses pre-adipocytes differentiation in 3T3-L1 cells and adiposity in obese mice[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 106: 355-362.
- [4] JUNG S, SON H, HWANG CE, et al. The root of Polygonum multiflorum thunb. alleviates non-alcoholic steatosis and insulin resistance in high fat diet-fed mice[J]. Nutrients, 2020, 12(8): 2353.
- [5] 李妹娟, 王和生, 王通渤, 等. 制何首乌中大黄素对 ApoE-/- 小鼠动脉粥样硬化模型中 JAK2/STAT3 通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(18): 101-106.
- [6] 解静, 高杉, 李琳, 等. 网络药理学在中药领域中的研究进展与应用策略[J]. 中草药, 2019, 50(10): 2257-2265.
- [7] 王文军, 丁一, 窦芳, 等. 分子对接在中药药效物质筛选及作用机制研究中的应用进展[J]. 中国药师, 2018, 21(6): 1020-1023.
- [8] 王浩, 杨健, 周良云, 等. 何首乌化学成分与药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 192-205.
- [9] 袁炜. 何首乌的化学成分研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017.
- [10] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules[J]. Sci Rep, 2017, 7: 42717.
- [11] DAINA A, MICHIELIN O, ZOETE V. SwissTargetPrediction: updated data and new features for efficient prediction of protein targets of small molecules[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W357-W364.

- [12] DENNIS G Jr, SHERMAN BT, HOSACK DA, *et al.* DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery [J]. *Genome Biol*, 2003, 4(9): R60.
- [13] HUANG DW, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources[J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44–57.
- [14] HUANG DW, SHERMAN BT, LEMPICKI RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists[J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(1): 1–13.
- [15] 裴宇鹏, 杨关林, 陈智慧, 等. 构建动脉粥样硬化“痰瘀论治、健脾为要”治则治法新理论体系[J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(8): 32–34.
- [16] 黄赛忠, 孙杰, 于佳卫, 等. 化痰逐瘀通脉颗粒治疗进展性脑梗死痰瘀阻络证的临床研究[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2020, 18(19): 78–80.
- [17] 陆炳旭, 王阶, 陈光, 等. 血脂异常的“痰瘀虚”中医病机内涵和临床应用[J]. *中国临床保健杂志*, 2021, 24(1): 137–140.
- [18] 姚利锋, 赵静, 赵丹丹. 制首乌颗粒治疗高脂血症临床研究[J]. *新中医*, 2020, 52(16): 59–61.
- [19] LEE YH, HSU HC, KAO PC, *et al.* Augmented insulin and leptin resistance of high fat diet-fed APP^{swe}/PS1^{dE9} transgenic mice exacerbate obesity and glycemic dysregulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2333.
- [20] BHUSHAN B, BANERJEE S, PARANJPE S, *et al.* Pharmacologic inhibition of epidermal growth factor receptor suppresses nonalcoholic fatty liver disease in a murine fast-food diet model [J]. *Hepatology*, 2019, 70(5): 1546–1563.
- [21] CHOUNG S, KIM JM, JOUNG KH, *et al.* Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates non-alcoholic fatty liver disease in diet-induced obese mice[J]. *PLoS One*, 2019, 14(2): e0210828.
- [22] GUO DL, BELL EH, MISCHEL P, *et al.* Targeting SREBP-1-driven lipid metabolism to treat cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(15): 2619–2626.
- [23] ZHU L, MARTINEZ MN, EMFINGER CH, *et al.* Estrogen signaling prevents diet-induced hepatic insulin resistance in male mice with obesity [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 306(10): E1188–E1197.
- [24] QIU SQ, VAZQUEZ JT, BOULGER E, *et al.* Hepatic estrogen receptor α is critical for regulation of gluconeogenesis and lipid metabolism in males[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 1661.
- [25] VACEK TP, REHMAN S, NEAMTU D, *et al.* Matrix metalloproteinases in atherosclerosis: role of nitric oxide, hydrogen sulfide, homocysteine, and polymorphisms [J]. *Vasc Health Risk Manag*, 2015, 11: 173–183.
- [26] WU XY, CHEN LJ, ZEB F, *et al.* Clock-Bmal1 mediates MMP9 induction in acrolein-promoted atherosclerosis associated with gut microbiota regulation [J]. *Environ Pollut*, 2019, 252 (Pt B): 1455–1463.
- [27] YANG HL, CAO QY, XIONG XL, *et al.* Fluoxetine regulates glucose and lipid metabolism via the PI3K/AKT signaling pathway in diabetic rats [J]. *Mol Med Rep*, 2020, 22(4): 3073–3080.
- [28] ARAI T, TANAKA M, GODA N. HIF-1-dependent lipin1 induction prevents excessive lipid accumulation in choline-deficient diet-induced fatty liver [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14230.
- [29] PALMISANO BT, LE TD, ZHU L, *et al.* Cholesteryl ester transfer protein alters liver and plasma triglyceride metabolism through two liver networks in female mice [J]. *J Lipid Res*, 2016, 57(8): 1541–1551.
- [30] BOEHM-CAGAN A, BAR R, LIRAZ O, *et al.* ABCA1 agonist reverses the ApoE4-driven cognitive and brain pathologies [J]. *J Alzheimers Dis*, 2016, 54(3): 1219–1233.
- [31] 何金涛, 于红红, 俞琦, 等. 中医药调控肠道微生态防治血脂异常相关疾病的研究进展 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(22): 3258–3262, 3269.
- [32] 周剑杰, 谭子虎. 运用数据挖掘探讨老年性痴呆的中药用药规律 [J]. *世界中医药*, 2021, 16(12): 1866–1870.
- [33] CHAO AC, CHEN CH, WU MH, *et al.* Roles of Id1/HIF-1 and CDK5/HIF-1 in cell cycle reentry induced by amyloid-beta peptide in post-mitotic cortical neuron [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2020, 1867(4): 118628.
- [34] SHIN BK, KANG SN, KIM DS, *et al.* Intermittent fasting protects against the deterioration of cognitive function, energy metabolism and dyslipidemia in Alzheimer's disease-induced estrogen deficient rats [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2018, 243(4): 334–343.
- [35] WANG YP, LIN Y, WANG LH, *et al.* TREM2 ameliorates neuroinflammatory response and cognitive impairment via PI3K/AKT/FoxO3a signaling pathway in Alzheimer's disease mice [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(20): 20862–20879.

编辑:刘卓越/接受日期:2022-11-15